

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УО «ВИТЕБСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ОРДЕНА ДРУЖБЫ НАРОДОВ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ДОСТИЖЕНИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ, КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ И ФАРМАЦИИ

Материалы 69-ой научной сессии сотрудников университета

29-30 января 2014 года

УДК 616+615.1+378
ББК 5Я431+52.82я431
Д 70

Редактор:

Профессор, доктор медицинских наук В.П. Дейкало

Заместитель редактора:

доцент, кандидат медицинских наук С.А. Сушков

Редакционный совет:

Профессор В.Я. Бекиш, профессор Г.Н. Бузук,
профессор С.Н. Занько, профессор В.И. Козловский,
профессор Н.Ю. Коневалова, д.п.н. З.С. Кунцевич,
д.м.н. Л.М. Немцов, профессор В.П. Подпалов,
профессор М.Г. Сачек, профессор В.М. Семенов,
доцент Ю.В. Алексеенко, доцент С.А. Кабанова,
доцент Л.Е. Криштопов, доцент С.П. Кулик,
ст. преп. Л.Н. Каныгина.

ISBN 978-985-466-694-5

Представленные в рецензируемом сборнике материалы посвящены проблемам биологии, медицины, фармации, организации здравоохранения, а также вопросам социально-гуманитарных наук, физической культуры и высшей школы. Включены статьи ведущих и молодых ученых ВГМУ и специалистов практического здравоохранения.

УДК 616+615.1+378
ББК 5Я431+52.82я431

ISBN 978-985-466-694-5

© УО “Витебский государственный
медицинский университет”, 2014

ВЛИЯНИЕ СТРЕССА НА МИКРОСТРОЕНИЕ ПЕЧЕНИ

Гусакова Е.А., Городецкая И.В.

УО «Витебский государственный медицинский университет»

Актуальность. Установлено, что печень, как полифункциональный орган, регулирующий гомеостаз, является объектом поражения при действии стрессоров. Однако изменение гистологической картины печени при стрессе «свободного плавания в клетке» (СПК) с преимущественно эмоциогенным характером индукции стрессорной патологии исследовано недостаточно.

Цель. Изучить влияние стресса СПК разной продолжительности на микроскопическое строение печени крыс.

Материал и методы. Опыты поставлены на 130 беспородных белых крысах-самцах массой 220 – 250 г. Стресс моделировали по методике СПК [1]. Животных помещали на 1 час в стандартную пластиковую клетку (50х30х20 см), заполненную водой (22°C) на высоту 15 см и закрывали сверху сеткой. Крыс брали в эксперимент через 1 час (стадия тревоги), 48 часов после стресса (стадия устойчивости) и после стресса по 1 часу в течение 10 суток (стадия истощения). Животных забивали декапитацией под уретановым наркозом (0,1 г/100 г массы тела).

Для приготовления гистологических препаратов материал фиксировали в забуференном растворе 10% нейтрального формалина. Окраску осуществляли гематоксилином и эозином. Оценку морфологических признаков проводили с помощью микроскопа Leica DM 2000 с видеопроекционной системой при увеличении $\times 630$. В каждом препарате в 5 полях зрения изучали дистрофические, некротические изменения гепатоцитов и состояние кровенаполнения синусоидных капилляров. Дистрофические изменения гепатоцитов оценивали следующим образом: 0 – отсутствуют, 1 балл – легкая степень (очаговая дистрофия), 2 балла – умеренная степень (очагово-диффузная дистрофия), 3 балла – тяжелая степень (диффузная гидропическая дистрофия). Выраженность некротических изменений гепатоцитов выражали в баллах: 0 – нет, 1 – некроз единичных клеток, 2 – очаговый некроз, 3 – обширный центроглобулярный некроз [2]. Состояние кровенаполнения синусоидных капилляров оценивали также в баллах: 0 – нет изменений, 1 – слабые изменения (в 1-2 полях зрения), 2 – умеренные изменения (в 3-4 полях зрения), 3 – выраженные изменения (во всех полях зрения) [3].

Концентрацию тиреотропного гормона (ТТГ) и ЙТГ в крови – общих трийодтиронина (T_3) и тироксина (T_4), их свободных фракций ($T_{3св}$ и $T_{4св}$) – определяли радиоиммунологически с помощью наборов реактивов ИРМА-ТТГ-СТ, РИА- T_3 -СТ, РИА- T_4 -СТ (Институт биоорганической химии НАН Беларуси), РИА FT_3 , РИА FT_4 (IMMUNOTECH, A BeckmanCoulterCompany, Чехия).

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы «Статистика 6.0».

Результаты и обсуждение. Концентрация T_3 в крови intactных крыс составила 1,651 (1,574; 1,689) нмоль/л, T_4 – 67,097 (62,367; 73,592) нмоль/л,

$T_{3св}$ – 3,717 (3,582; 4,145) пмоль/л, $T_{4св}$ – 13,869 (13,099; 14,815) пмоль/л, ТТГ – 0,187 (0,173; 0,265) мМЕ/л. Введение 1% крахмального клейстера контрольным животным не оказало влияния на сывороточные уровни ЙТГ и ТТГ. В гистологических препаратах печени крыс группы «Контроль» отмечалось четкое балочно-радиальное строение печеночных долек. Границы клеток ясно визуализировались. Ядра гепатоцитов располагались в центре. Состояние кровенаполнения внутريدольковых синусоидных капилляров соответствовало норме. Дистрофические изменения гепатоцитов и их некроз не определялись. Строма портальных трактов и паренхима печени были без признаков инфильтрации.

Через 1 час после СПК концентрация ЙТГ в крови, особенно, их свободных фракций увеличилась: T_3 – на 26%, T_4 – на 28%, $T_{3св}$ – на 64%, $T_{4св}$ – на 54%. В ответ на возрастание сывороточного уровня ЙТГ содержание ТТГ снижалось – на 66%. У 70% крыс развивались дистрофические изменения гепатоцитов, которые проявлялись в набухании клеток, сглаживании межклеточных границ. При этом у 60% (табл. 1) животных наблюдалась очаговая дистрофия (1 балл), а у 10% – очагово-диффузная (2 балла) ($p < 0,05$). У 60% животных отмечалось повышение кровенаполнения синусоидных капилляров (1 балл) ($p < 0,05$).

Через 48 часов после СПК сывороточные уровни ЙТГ и ТТГ возвращались к исходным величинам. В указанный период у 60% животных отмечались дистрофические изменения гепатоцитов, которые характеризовались тяжестью 1 балл ($p < 0,05$). Слабые (1 балл) изменения кровенаполнения синусоидных капилляров наблюдались также у 60% крыс ($p < 0,05$). По отношению к стадии тревоги дистрофия клеток печени и кровенаполнение синусоидных капилляров были такими же ($p > 0,05$).

После 10 суток ежедневного стрессирования по 1 часу в отличие от предшествующей стадии происходило снижение сывороточного уровня ЙТГ: T_3 – на 20%, T_4 – на 24%, $T_{3св}$ – на 27%, $T_{4св}$ – на 35%. В ответ на падение содержания ЙТГ в крови концентрация ТТГ возрастала – на 161%, что свидетельствует о сохранении нормальных регуляторных взаимоотношений в системе гипоталамус-гипофиз-щитовидная железа. Повреждение гистоструктуры печени было наибольшим по сравнению с предыдущими стадиями. Дистрофические изменения гепатоцитов наблюдались у 100% крыс (табл. 1), их тяжесть составляла 1 балл у 70% животных и 2 балла у 30% ($p < 0,001$). Увеличение кровенаполнения синусоидных капилляров регистрировалось у 90% крыс и имело выраженность 1 балл у 50% животных и 2 балла – у 40% ($p < 0,001$). В синусоидных капиллярах отмечались явления застоя крови и сладж-феномен. В отличие от предыдущих стадий в гепатоцитах развивались некротические изменения, проявляющиеся в исчезновении границ между клетками и лизисе отдельных ядер. Они регистрировались у 70% крыс. При этом у 60% животных наблюдался

некроз единичных клеток (1 балл), а у 10% – очаговый некроз в пределах дольки (2 балла) ($p < 0,01$). Визуализировалась и слабо выраженная лимфоцитарная инфильтрация (в основном лимфоцитами и макрофагами), которая локализовалась в области портальных трактов в строме дольки и по ходу синусоидных капилляров.

Выводы. Стадия тревоги стресс-реакции, характеризующаяся активацией тиреоидной функции и (за счет срабатывания короткой петли обратной связи в гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной системе) падением содержания ТТГ в крови, вызывает появление дистрофических изменений клеток печени и активацию внутридолькового кровотока в ее синусоидных капиллярах. Стадия устойчивости стресс-реакции, сопровождающаяся восстановлением тиреоидного гомеостаза, характеризуется такими же изменениями гистоструктуры печени, как стадия тревоги. Стадия истощения стресс-реакции

характеризуется угнетением тиреоидной функции и развитием микроциркуляторных нарушений в печени, дистрофических изменений гепатоцитов, а также появлением их некроза.

Литература:

1. Бондаренко, С. Н. Влияние различных методов стрессирования и адаптации на поведенческие и соматические показатели у крыс / С. Н. Бондаренко, Н. А. Бондаренко, Е. Б. Манухина // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1999. – Т. 128, № 8. – С. 157–160.
2. Патоморфологические критерии оценки состояния печени у потенциальных доноров со смертью мозга / Л. В. Шкалова [и др.] // Оригинальные исследования. – 2011. – Т. 4. – С. 7–13.
3. Морфологическая характеристика экспериментального периодонтита / Л. Н. Дедова [и др.] // Стоматол. журн. – 2005. – №. 3. – С. 12–18.

МЕТОДИКА АНАЛИЗА ГИСТОПРЕПАРАТОВ, ОКРАШЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ МОНО- И ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Дворецкий Е.О., Самсонова И.В., Генералов И.И.

УО «Витебский государственный медицинский университет»

Актуальность. В последние годы метод ИГХ нашел широкое применение как в диагностике различных заболеваний (главным образом, в дифференциальной диагностике опухолей), так и в научно-исследовательской работе. Большое количество поли- и моноклональных антител (АТ), обладающих высокой специфичностью и авидностью расширяет спектр научных задач, и на сегодня использование ИГХ методик практически не ограничено. Однако, всегда актуальными остаются оценка качества приготовления препаратов и правильная интерпретация полученных результатов окрашивания, нередко требующие выполнения в реальном времени.

Цель. Разработать методику автоматической оценки гистопрепаратов, окрашенных иммуногистохимически с помощью моно- и поликлональных антител.

Материал и методы. Для реализации поставленной цели использовался оптический микроскоп Leica DMI 2000 с CCD камерой Leica DFC 295 (аппаратная часть). Программная часть строилась на основе интерпретатора языка python, библиотек opencv (обработка изображений) и Qt (построение интерфейса пользователя). Захват видеопотока с камеры обеспечивал адаптер Baumer optronics, поставляемый вместе с Micro-Manager.

С их помощью выполняли оценку присутствия маркера и степень его экспрессия, о чем судили по интенсивности окрашивания.

Результаты. Кадры, полученные с помощью видеокамеры, при необходимости предобрабатывались гауссовым размытием. Далее рассчитывались маски и площадь объектов:

Маска 1 – рассчитывалась для яркостной компоненты кадра. Пиксели изображения классифицировались на две группы на основе яркости для удаления пустого фона. При этом пороговое зна-

чение задавалось вручную или определялось при помощи метода Оцу. Таким образом, можно определить процент площади, занимаемой клетками ко всему полю зрения.

Маска 2 – применялась для выделения объектов (например, ядер) по цвету. Пороги бинаризации устанавливались вручную в цветовом пространстве HSL.

Маска 3 – равнялась логическому «и» для полученных масок и позволяла учитывать только необходимые цветные объекты (ядра) маски 2 в пределах «не-фона» маски 1. Это позволяет рассчитать площадь, занимаемую красителем, относительно площади клеток.

Как обязательный компонент для архивации данных нами предусмотрена возможность фотографирования полей зрения с одновременным сохранением рассчитанных морфометрических характеристик для последующей статистической обработки.

Выводы.

Предлагаемая методика позволяет в реальном времени оценить качество ИГХ-окрашивания препарата и получить морфометрические характеристики степени экспрессии маркеров с возможностью архивации как фото-, так и морфометрических данных.

Литература:

1. Opencv documentation [Electronic resource]. – Mode of access: <http://docs.opencv.org>. – Дата доступа: 1.08.2013.
2. Micromanagement documentation [Electronic resource]. – Mode of access: <https://valelab.ucsf.edu>. – Дата доступа: 1.08.2013.
3. Sezgin, M. Survey over Image Thresholding Techniques and Quantitative Performance Evaluation / M. Sezgin, B. Sankur // J Electronic Imaging. – 2004. – Vol. 13, N 1. – P. 146–165.